

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-151397

(43)Date of publication of application : 27.06.1991

(51)Int.Cl.

C07H 17/00
 C07D233/64
 C07D263/32
 C07D277/34
 C07F 9/6506
 C07F 9/653
 C07F 9/6539
 C12Q 1/00
 C12Q 1/34

(21)Application number : 02-276586

(71)Applicant : BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

(22)Date of filing : 17.10.1990

(72)Inventor : GUDER HANS-JOACHIM
 GUETHLEIN WERNER
 WECKERLE WOLFGANG
 BERGER JOHANN
 BUCK HARVEY
 HERRMANN RUPERT

(30)Priority

Priority number : 89 422496 Priority date : 17.10.1989 Priority country : US

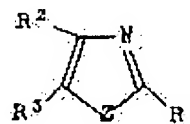
(54) HYDROLASE SUBSTRATE, DETECTING AGENT OF HYDROLYTIC SUBSTANCE,
 DETECTION METHOD AND TEST STRIP OF DETECTING ANALYTE

(57)Abstract:

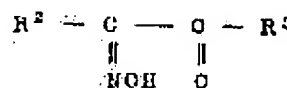
NEW MATERIAL: A compound of formula I [Z is O, S,
 =N-R₄ (R₄ is H or alkyl); R₁-R₃ are each H, alkyl, aralkyl
 or aromatic group, provided that at least one of R₁-R₃ is
 an aromatic group substd. by -O-X (X is glycosyl, acyl,
 etc.)].

EXAMPLE: 4[(4-(4-Dimethylaminophenyl)5-methyl)1H-
 imidazol2-yl]-2methoxyphenol hydrochloride.

USE: Hydrolase substrates useful in the detection of



I



II

hydrolase.

PROCESS: For example, the compound of formula I when Z is =NH and X is glycosyl is obtained by reacting an α -ketooxime of formula II with an aldehyde of the formula $O=CH-R1$ and ammonia and reducing the resultant compound of formula III with zinc/acetic acid, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A)

平3-151397

⑤Int. Cl.⁵C 07 H 17/00
C 07 D 233/64
263/32

識別記号

1 0 1

庁内整理番号

7822-4C
8412-4C
7624-4C※

⑬公開 平成3年(1991)6月27日

審査請求 有 請求項の数 4 (全22頁)

⑭発明の名称 新規化合物、加水分解酵素活性を有する物質の検出剤及び検出方法
並びに分析物を検出するための試験条片

⑰特 願 平2-276586

⑱出 願 平2(1990)10月17日

優先権主張 ⑳1989年10月17日㉑米国(US)㉒422496

⑲発 明 者 ハンス・ヨアヒム・グ ドイツ連邦共和国ヴァイルハイム・シュヴァツタツハヴェ
ーダー ーク 1

⑲出 願 人 ベーリンガー・マンハ ドイツ連邦共和国マンハイム31・ザントホーフエルストラ
イム・ゲゼルシャフ ーセ 116
ト・ミット・ベシユレ
ンクテル・ハフツング

⑲代 理 人 弁理士 矢野 敏雄 外1名
最終頁に続く

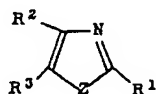
明 細 書

1 発明の名称

新規化合物、加水分解酵素活性を有する物質
の検出剤及び検出方法並びに分析物を検出す
ための試験条片

2 特許請求の範囲

1. 式 I :



[式中、Zは酸素、硫黄又は基 N-R^4 を表し、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一又は異なるものであつてよく、水素、アルキル-又はアラルキル基又は芳香族基を表し、 R^4 は水素又はアルキル基を表し、式中、基 R^1 、 R^2 及び R^3 の1個又は数個は基：



(式中、Oは酸素を表し及びXはグリコシル-、ホスフェート-又はアシル基を表す)によつて置換された芳香族基を表す]の新規化合物。

2. 請求項1に記載の化合物少なくとも1種類を含有することを特徴とする、試料中の加水分解酵素活性を有する物質の検出剤。

3. 試料を加水分解酵素基質及び緩化剤と混合し、生じる色強度を評価することによつて、試料中の加水分解酵素活性を有する物質を検出するための方法において、加水分解酵素基質として請求項1に記載の化合物少なくとも1種類を使用することを特徴とする、加水分解酵素活性を有する物質の検出方法。

4. 加水分解酵素で標識付けした化合物及び加水分解酵素基質を使用して分析物を検出するための試験片において、加水分解酵素基質として、吸収性支持体上に含浸させてある式Iの化合物を使用することを特徴とする、分析物を検出するための試験片。

3 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、新規加水分解酵素基質、その製法、及び試料中の加水分解酵素活性を有する物質を

検出するための方法に関する。

〔従来の技術〕

加水分解酵素は、最近重要となつた酵素である。これは一方では、植物、動物及び人間の物質代謝で重要な役割を演じる。生物系で加水分解酵素の濃度が、その中に一般に存在する濃度と異なっている場合には、これが病気の原因である可能性がある。従つて、臨床診断の課題は、病気が存在する場合に、体液中の加水分解酵素の濃度を測定することによつて正常値との相違を確認することである。これは有利には、指示薬反応により加水分解酵素活性を測定することによつて行われる。このために検査すべき試料に、該当する加水分解酵素の基質を加える。基質から生成される生成物の量は、存在する加水分解酵素濃度の目安である。

他方、加水分解酵素は免疫活性化合物を標識付けするための酵素として頻繁に使用される。その際、免疫試験で例えば抗体を標識付けするために β -ガラクトシダーゼが特に広く使用さ

もできる。酵素標識として β -ガラクトシダーゼを使用するこの種の方法は、西ドイツ特許 (DE-A) 第2915082号明細書に詳説されている。この場合でも、標識付けの量を指示薬反応で測定する。

加水分解酵素は研究試薬としても使用される。この場合にも、酵素の濃度を正確かつ迅速に測定することができることが重要である。このために、一般に臨床診断で使用されるものと同じ方法を使用することができる。

その際、基質は大抵の場合に試料液体に可溶性の化合物である。加水分解酵素との反応で、その特性において、例えば特徴的な吸光、光放出(蛍光)等によつて基質と相違し、それによつて検出することができる生成物が形成される。

免疫活性物質に関する試験方法には、二つの異なる技術的態様がある。しばしば使用される態様では、測光法による検査で一般的に使用されるように、検出反応はキュベット中で行われる。次いで、指示薬反応の評価を、吸光、放射

れる〔アナールス オブ クリニカル バイオケミストリー (Annals of Clinical

Biochemistry) 第16巻、221頁(1979年)〕。この種の試験は、試料中の免疫活性分析物の含量を測定するために役立つ。これは、分析物の濃度を、標識として共有結合した β -ガラクトシダーゼを有する一過性の免疫相手を介して測定することから成る。この試験を実施することによつて、免疫相手の濃度が測定すべき分析物の濃度に直接左右されることになる。標識付けされた免疫相手の濃度は同様に指示薬反応により可視性になる。支持薬反応で β -ガラクトシダーゼで標識付けされた免疫相手を β -ガラクトシダーゼの基質と反応させる。

生成物の形成量は、免疫相手の濃度に比例する。公知分析物濃度を有する試料を用いて作成した検量線の値と比較することによつて、試料中の未知の分析物濃度を測定することができる。

加水分解酵素は、核酸を検出するための方法で核酸の標識付け用の酵素として使用すること

又は放射能の測定を適当な装置で測定することによつて行う。

その他の態様では、一部が試験支持体である一個又は数個のフリース又はフィルム中で反応が行われる。このフリース又はフィルム上に必要な試薬が塗布されている。指示薬反応の間に加水分解酵素基質から加水分解酵素活性によつて遊離される生成物の量を、次いでこの種のフリース又はフィルム中で直接測定することができる。この態様の利点は、大抵の場合にただ一種類の溶液、液体試料を用いて操作することができることであり、このことは方法の実施を著しく簡単にする。生じた生成物の量を吸光度を特定の波長で測定することによつて特に簡単に実施することができる。

このために好適な基質は、欧州特許 (EP-A) 第0146866号明細書に記載のフェノールスルホンフタレイニル- β -D-ガラクトシド及びその誘導体であり、これから β -D-グリコシダーゼとの反応によつてフェノールスルホ

ンフタレイン誘導体が遊離される。基質は黄色色調を有するが、生成物は赤色に着色する。従つて、指示薬反応の間に黄色から橙色をへて赤色への一般的な色変化が生じる。この色変化は肉眼では非常に正確にしか判定できないので、従つて、測定するために適当な測光器を使用せねばならない。

欧州特許(E P-A)第0156347号明細書に記載のレゾルフィン- β -D-グリコシドも、グリコシダーゼとの反応で黄色から赤色への色変化が起こる基質である。黄色と赤色の間の移行範囲では、特に低い β -グリコシダーゼ活性での視覚による評価は、主観的な結果を生じ、従つてこの場合にも評価するために装置が使用されることは明らかである。しかし、これらの装置は比較的複雑で、従つて高価である。レゾルフィングリコシドは、これから生成されるレゾルフィンがブリード(ausbluten)するので、試験支持体を使用するための基質としては好適ではない。

誘導体への酸化性ジメン化(Dimensierung)である。その後、色素分子を生成するために、基質の酵素による2回の分解が必要である。それによつて理論的に可能な感受性の半分しか得られない。

バイオヒエミツシエ ツアイトシュリフト(Biochemische Zeitschrift)第333巻、209頁(1960年)中で、基質として、加水分解でフェノールを遊離する化合物が提案された。しかし、これは試験支持体上でブリードしやすい。ニトロフェノールの場合には、指示薬反応の間に、多少の差はあれ黄色着色が起こる。少ない濃度の範囲で視覚による評価はニトロフェノールの成長では非常に不利である。

可視性を改良するために、不加的な反応で遊離したフェノールを酸化的にアミノアンチピリン又はメチルベンゾチアゾリノンヒドラゾンと結合させる[アナリテイカル バイオケミストリー(Analytical Biochemistry)第40巻281頁(1971年)]か又はジアゾニウム塩と反

加水分解酵素基質、例えばメチルウンベリフエロンガラクトシドも、その加水分解で蛍光特性の変化しか起こらないので、視覚による評価に好適ではない。これから生成されるメチルウンベリフエロンも試験紙からブリードしやすい。

加水分解酵素との反応で有色の生成物に変わる加水分解酵素基質が使用される。この検出反応では色変化ではなく、色の生成を評価すべきである。即ち、これは色強度を色尺度の色調と比較することによつて簡単に行うことができる。色盲の人でもこの種の試験は評価することができる。

この種の基質は、5-プロム-4-クロル-3-インドリル- β -ガラクトシドである。この基質は分離及び酸化後に試験支持体からブリードしない色素を生じる。しかし、基質自体は僅かにしか水溶性でない。従つて、これを基礎とする試験は迅速な視覚評価にはあまり適さない。色生成を生じる機構は、2個の5-プロム-4-クロル-インドリル単位のインジゴ色素

応させてアゾ色素にする[例えば、ヒストヒエミー(Histochemie)第37巻、89頁(1973年)]。これらの色素は大抵、あまり簡単にブリードしないので、試験支持体を使用するために好適であるが、これらのカップリング反応の使用は、その他の理由から不利である。フリース又はフィルム上で試験を実施するために、この付加的な反応に必要な試薬を全て同様にフリース上に塗布するか又はフィルム中に導入しなければならない。多数の試薬、例えばカップリング成分は試験実施を複雑にし、多くの欠点及び困難をもたらす；即ち、個々の場合に、試薬が時期尚早に相互にか又は試料溶液のその他の成分と非特異的に反応しないように注意する必要がある。即ち、アミノアンチピリン又はメチルベンゾチアゾリノンヒドラゾンは、成分と、例えば被検尿中で反応し、測定に誤差を生じる恐れがある。その他のカップリング成分、例えばジアゾニウム塩は貯蔵安定性を著しく損なり。試薬を選択する場合に、試薬が既にそれ自体固

有の色を有さないこと等に配慮せねばならない。

生成された若干の色素で試験支持体上で起こるブリード現象は、例えば、色強度がフリース又はフィルムの全場所と同じではないという結果を生じ、これは評価する際に不利となる。即ち、例えば測定値に誤差が生じる。

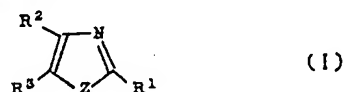
〔発明が解決しようとする課題〕

従つて、前記欠点を回避し、それを用いて加水分解酵素活性を有する物質を試験支持体上でも簡単に、迅速かつ正確に検出することができる加水分解酵素基質への要求が存在した。

本発明の課題はこの要求を満たすことであつた。

〔課題を解決するための手段〕

この課題は、式 I :



〔式中、Zは酸素、硫黄又は基 >N-R^4 を表し、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一又は異なるものであつ

基及びピリジル基である。

置換された芳香族基は、有利には炭素原子が1個又は数個のハロゲン、ヒドロキシル-、アルコキシ-、アルキル-、アミノ-、モノ-又はジアルキルアミノ-、カルボキシル-、カルバモイル-、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニル-、ホルミル-又はスルホ基又は基 -O-X により置換されているフェニル-及びナフチル基である。芳香族基は種々のこれらの置換分を同時に有していてもよい。ハロゲンとしては、塩素、臭素及びヨウ素、特に塩素が有利である。

芳香族基のアルキル基及び芳香族基の個々の置換分中のアルキル基は、有利には炭素原子1~6個、特に1~4個を有し、それ自体置換されていてもよいし、置換されていなくともよい。特にメチル基が有利である。アルキル基の置換分としては、ハロゲン又はヒドロキシ-、アルコキシ-、カルボキシ-、スルホ-、ホスホノ-又はモルホリノ基が有利である。

カルボキシル-、スルホ-及びホスホノ基は、

よく、水素、アルキル-又はアラキル基又は芳香族基を表し、 R^4 は水素又はアルキル基を表し、式中、基 R^1 、 R^2 及び R^3 の1個又は数個は基：



によつて置換された芳香族基を表す〕の化合物により解決される。

基 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 のアルキル基は有利には炭素原子1~6個を有する。特に、炭素原子1~4個を有するアルキル基が有利であり、更に特に有利なのはメチル基である。

基 R^1 、 R^2 及び R^3 のアラキル基としては、炭素原子7~11個を有するアラキル基、特にベンジル基が有利である。

基 R^1 、 R^2 及び R^3 の芳香族基は、置換されていてもよいし、置換されていなくともよく、有利には炭素原子6~12個を有する。

置換されていない基としては、フェニル-及びナフチル基が有利である。その他の可能な基は例えば、ヘテロアリール基、例えばフーリル

例えばメタノール又はエタノールでエステル化されていてもよい。

芳香族基の有利な置換位置はメタ-及びパラ位である。

特に有利な式 I の化合物は、式中、基 R^1 、 R^2 及び R^3 の一つが基 -O-X により置換されたフェニル基であり、もう一つ又は二つのその他の基が、1個又は数個の電子押しだし性置換基、例えばヒドロキシ基、置換された又は非置換されたアミノ基又はアルコキシ基等を有する芳香族基であるような化合物である。電子押しだし性置換基 (elektronenschiebende Substituenten) の有利な置換位置は、パラ位である。アミノ基の有利な置換基は、炭素原子1~4個を有するアルキル基、特に有利にはメチル-及びエチル基であり、又は炭素原子1~6個を有するアシル基、有利にはアセチル基である。2置換されたアミノ基が有利である。

基 -O-X を有する芳香族基は同様に付加的に置換されていてもよい。有利な置換基はアルコキ

シ-及びアルキル基である。特にメトキシ基が有利である。基-O-Xを有さない基 R^1 、 R^2 及び R^3 の芳香族基としては、4-ジメチルアミノフェニル-、9-ユロリジノ-、4-C₁~C₄-アルコキシフェニル基、特に有利には4-メトキシフェニル基並びに6-N-メチル-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-基が有利であり、その際、メチル置換分はカルボキシル-、ホスホノ-又はスルホ-基を有していてもよい。

基-O-X中で、Oは酸素を表し、Xはグリコシル-、ホスフエート-又はアシル基を表す。

基Xのグリコシル基はヘキソースピラノシド系の単-、少-及び多糖基である。有利には、単糖基、例えばグリコシル-及びガラクトシル基又は所望によりアシル化された、有利にはN-アセチル化されていてもよいグルコサミン基である。グルコシド基の結合は、 α -又は β -グリコシド的であつてよい。

基Xのアシル基は有利には炭素原子1~20個を有し、飽和又は不飽和、直鎖又は分枝鎖状

であつてよい。特にアシル基が有利である。

アシル基にはアミノアシル基も該当する。アミノアシル基として有利には、天然起源の α -L-アミノ酸のカルボキシル基を介して結合した基である。その際、アミノ酸の遊離極性基、例えばアミノ官能基は好適な保護基により保護されていてもよい。この種のアミノ酸は、例えばアミノ酸基は例えばアミノ基にトシル基を有するアラニル基である。

ホスフエート基は基-PO₃H₂及びその塩である。これらの塩中の陽イオンとしては、全ての陽性に荷電したイオンが挙げられる。有利にはアルカリ金属、アルカリ土類金属及びアンモニウムイオンであり、特にナトリウム-、カリウム-、マグネシウム-及びカルシウムイオンが有利である。

式Iの化合物中で基 R^1 、 R^2 及び R^3 は全て基-O-Xにより置換された芳香族基を表すことができる。しかし、式中、基 R^1 、 R^2 及び R^3 の最高2個、特に有利には1個だけがその種の

芳香族基を表す式Iの化合物が有利である。

Zが酸素又は硫黄を表す場合には、 R^1 及び R^2 がこれらの基であるが、 R^3 は水素を表さない化合物が有利である。

Zが酸素又は硫黄を表す場合には、式中、基 R^1 及び R^2 の一つだけが基-O-Xにより置換された芳香族基を表す式Iの化合物が特に有利である。基 R^1 、 R^2 及び R^3 からの2つの基が、基-O-Xにより置換された芳香族基を表さない場合には、両方のヒドロキシ基又は非置換のアミノ基を有するような芳香族基ではないようなものが有利である。しかし、例えばこの両方の基として、一つがヒドロキシ基によつて、もう一つが置換されたアミノ基によつて置換された芳香族基を表すようなものでないのが有利である。

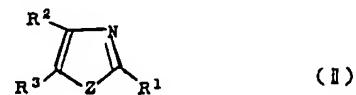
Zが基 --N--R^4 を表す場合には、式中、基 R^1 、 R^2 及び R^3 の一つだけが基-O-Xにより置換された芳香族基を表す式Iの化合物が有利である。
- R^1 がこの基である場合には、式中 R^2 及び R^3 が同時にはヒドロキシ基又はアミノ基により置

換された芳香族基を表さないか又は二つの基の一つがアミノ基により、もう一つがヒドロキシ基によつて置換された芳香族基を表す化合物が有利である。

- R^2 又は R^3 がこの基である場合には、式中、 R^1 及びその他の基 R^3 又は R^2 が同時にはヒドロキシ基又はアミノ基により置換された芳香族基を表さない化合物が有利である。

式Iの化合物は、新規化合物である。

この化合物は、式II:



〔式中、Z、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は前記のものを表し、その際、基 R^1 、 R^2 及び R^3 の1個又は数個は基-O-Xの代わりに基-O-Hにより置換された基を表す〕の化合物を、式III:



〔式中、Xは前記のものを表し、Yは反応性基を表す〕の化合物と反応させることによつて製

造することができる。

Xがグリコシル基である場合には、類似の化合物におけるように炭化水素化学から公知である方法を使用することができる。

このために、式Ⅱの化合物を式Ⅲの活性糖と反応させる。その際、式中Yが良好な出現性の親核性基、例えばハロゲン、特に塩素又は臭素又はスルホニルオキシ基、特にトルオルスルホニルオキシ-又はメタンスルホニルオキシ基を表す化合物が有利であると実証された。その際、遊離ヒドロキシ-又はアミノ基が反応の間に好適な保護基により保護されたままであるのが有利であると実証された。その際、基-O-Xに変えるべきである基-O-Hはもちろん保護基を有してはならない。

Xがアシル基である場合には、アルコール並びに特にフェノールからエステルを有機カルボン酸との反応により製造するために一般に公知である方法を使用することができる。アミノ酸の官能基はエステル化の前に有利には好適な保

オン交換体により遊離酸から製造することができる。

式Ⅱ及びⅢの化合物は公知化合物であるか、又は有機合成の公知方法と同様にして製造することができる。特にトリアリールイミダゾールが西ドイツ特許(DE-A)第2,735,690号明細書から公知である。欧州特許(EP-B)第0161436号及び欧州特許(EP-A)第0167973号明細書にも式Ⅱの化合物が記載されている。使用にはヒドロキシペルオキシドの検出が含まれる。

本発明による式Ⅰの物質は、例えば、自体公知の方法によつてか、又はZが基 >N-R^4 を表し、Xがグリコシル基を表す場合には、式Ⅳ：



〔式中、 R^2 及び R^3 は前記のものを表す〕の α -ジケトンに式Ⅴ：



〔式中 R^1 は前記のものを表す〕のアルデヒド及

護基によりマスキングされる。反応により保護基を再び脱離することができる。反応性基Yは良好な出現性の親核基である。その際、特にハロゲン、アルコラート及びカルボキシレートが有利である。

式中、Xがホスフェート基である式Ⅰの化合物を製造するためには、式中Xが基 $-\text{POW}_2$ 又は $-\text{PW}_4$ 〔式中、Wは良好な脱離基、特にO原子1～4個を有するアルコラート又は塩素、臭素又はヨウ素を表す〕を表し、Yが基ハロゲン、有利には塩素、臭素又はヨウ素又はアルコラートを表す式Ⅰの化合物を製造するためには、特に有利には式 X-Y はオキシ三塩化磷である。この場合でも、遊離ヒドロキシ基及びアミノ基を、基-O-Xに変えられるヒドロキシ基を除いて、反応後に脱離可能な保護基によりマスキングすることが有利である。Xが基 $-\text{POW}_2$ 又は $-\text{PW}_4$ を表す化合物は公知方法でホスフェートに変えることができる。

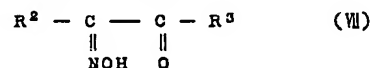
ホスフェートの塩は、公知方法で、例えばイ

びアンモニア又は式Ⅵ：

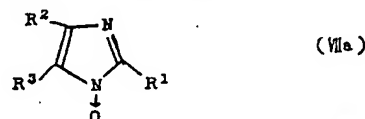


〔式中、 R^4 は前記のものを表す〕と氷酢酸中で縮合させるか又は

b) Zが基 >N-H を表し、Xがグリコシル基を表す場合には、式Ⅶ：

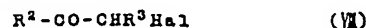


〔式中、 R^2 及び R^3 は前記のものを表す〕の α -ケトキシムに式Ⅴのアルデヒド及びアンモニア又は式Ⅵのアミンを反応させて、式Ⅶa)：

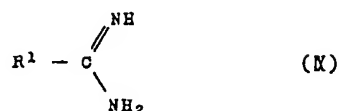


〔式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は式Ⅱに記載のものを表す〕の化合物にし、この化合物を還元するか又は

c) Zが基 >N-H を表し、Xがグリコシル基を表す場合には、式Ⅶ：

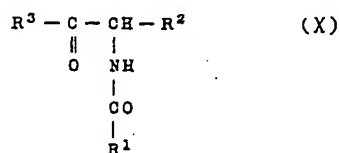


〔式中、 R^2 及び R^3 は前記のものを表し、Hal は弗素、塩素又は臭素を表す〕の α -ハロゲンケトンに式Ⅱ：



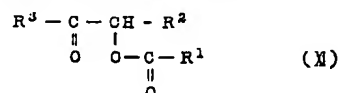
〔式中、 R^1 は前記したものを表す〕のアミジンとアルカリ媒体中で反応させるか又は

d) Z が酸素又は基 N-H を表す場合には、式Ⅲ：



〔式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は前記のものを表す〕の化合物をルイスの酸又はペンタスルフィドと反応させるか又は

e) Z が酸素を表す場合には、式Ⅳ：



(ニトロ \rightarrow アミン)、Pd / O を用いる水素添加による保護基の脱離 (O-ベンジル \rightarrow ヒドロキシル)、複素環の水素添加 (フラニル \rightarrow テトラヒドロフラニル)、水素添加による複素環の分解 (テトラヒドロフラニル \rightarrow 4-ヒドロキシブチル)、アミンの還元アルキル化 (アミン \rightarrow ジアルキルアミン) によつて行われる。

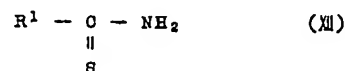
式Ⅰの 4-アミノ-化合物をハロゲン-メタン-又は 2-エタン-カルボン酸、-スルホン酸並びに-ホスホン酸又はその塩と DMF 中で反応させることによつて、相応する N-アルキルアミノ-メタン-又は 2-エタン-酸基が得られる。

式Ⅳa) の N-オキシデンの還元は、例えば亜鉛/酢酸又は触媒的に刺激された水素を用いて行うことができる。

式Ⅰの化合物の合成は、ジャーナル オブ オーガニック ケミストリー (Journal of Organic Chemistry) 第 2 巻 319 頁 (1937

〔式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は前記のものを表す〕の化合物を酢酸アンモニウムと氷酢酸中で反応させるか又は

f) Z が硫黄を表し、X がグリコシル基を表す場合には、式Ⅴ：



〔式中、 R^1 は前記のものを表す〕のチオアミドに式Ⅵ〔式中、 R^2 及び R^3 は前記のものを表し、Hal は弗素、塩素又は臭素を表す〕の α -ハロゲンケトンと反応させ、引き続き、所望により、得られた化合物を式Ⅰの化合物に変え並びに相応する塩基を塩に変えるか又は塩を塩基に変えることによつて製造することができる。

この方法で場合により存在する反応性官能基 (ここで反応は起こるべきではない) を、あとで再び脱離させることができる、公知保護基により保護することができる。

方法 a) ~ f) により得られる化合物を式Ⅰの化合物に変えることは、例えば、接触水素添加

年) 又はツァイトシュリフテ ヒュア ヒエミ (Zeitschrift fuer Chemie) 第 10 巻 431 頁 (1970 年) 及び第 11 巻 (1971 年) により行うことができる。

意外にも、本発明による式Ⅰの化合物は、加水分解酵素基質として非常に好適である。この化合物は加水分解酵素と接触しない限り、水溶性であり、無色で安定している。

非常に良好な水溶性が所望される場合には、有利には 1 個又は数個の極性基、例えばカルボキシル基、スルホ-又はホスホノ基が含まれている式Ⅰの化合物を使用する。

式Ⅰの化合物の溶解性は、反応媒体の極性を低下させることによつて、例えば有機溶剤、例えばアルコール、ジメチルスルホキシド又は清浄剤を添加することによつて達成することもできる。

本発明による方法で加水分解酵素基質として、分子部分 X が相応する加水分解酵素の天然の基物の分子と同じであるような式Ⅰの化合物が、

特に好適である。即ち、例えば β -ガラクトシダーゼ基質として、式中Xが β -ガラクトシル基を表す式Iの化合物が、エステラーゼ基質として、式中Xがアシル基を表すものが、そしてホスホターゼ基質として、式中Xがホスフェート基である式Iの化合物が特に好適である。

本発明の目的は、加水分解酵素基質として式Iの化合物少なくとも1種類を使用することを特徴とする、試料を加水分解酵素基質及び酸化剤と混合し、生じる色強度を評価することによって、試料中の加水分解酵素活性を有する物質を検出する方法でもある。

加水分解酵素活性を有する物質は、化学的な化合物を水の使用下で二つの生成物に分解することができる物質である。これには、天然起源又は人工的に製造される酵素主群3 (Enzymhauptklasse 3) の加水分解酵素が属する。本発明による方法はグリコシダーゼ、有利にはグリコシダーゼ及びガラクトシダーゼ及びエステラーゼ、有利にはリパーゼ及びホスファ

ターゼ、特に有利にはアルカリ性ホスファターゼ又は豚肝臓-エステラーゼの検出に特に有利であると実証された。

しかし、加水分解酵素活性を有する物質には、その他にこれらの加水分解酵素とその他の化学的化合物、例えば免疫学的に活性化合物又は核酸との化合物も含まれる。免疫学的に活性化合物には、例えばハプテン、抗原及び抗体及び免疫複合体が属す。しかし、これには抗体のフラグメント、例えばFab-又はF(ab')₂-フラグメントも含まれる。これらの加水分解酵素と免疫学的に活性の化合物との結合物は、しばしば加水分解酵素-複合体とも呼ばれる。その際、加水分解酵素は、免疫学的に活性の化合物を標識付けするために役立つ。特に本発明による方法は、標識として β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ並びにアルカリ性又は酸性ホスファターゼを用いる免疫学的に活性の化合物の検出に好適である。

加水分解酵素基質とは、加水分解酵素活性を

有する該当する物質による反応を受ける化合物のことである。この基質から、水の吸収下に二つの生成物が生成される。その際、反応は酵素運動学で公知の規則に従う。前提条件は、基質が少なくとも大部分加水分解酵素活性を含有する溶液に可溶性であることである。

試料とは、有利には固体又は液体試料である。

固体試料の場合には、可溶性と殆ど不溶性の試料に区別することができる。

可溶性試料は、有利には検出するために液体試料に変える。

殆ど不溶性の試料とは、有利には、その外又は内表面上に加水分解酵素活性を有する物質が結合している固体である。この結合の種類は本発明による方法に直接ではない。この結合は例えば、共有結合的なものであつてもよいし、イオン又は吸着性のものであつてもよいし又は生物特異的なものであつてもよい。生物特異的な結合は生物学的結合相手間の結合、例えば抗原又はハプテンとして作用する物質と抗体、ヒオ

テンとアビジン又はストレプトアビジン、相補的核酸等との間の結合である。

加水分解酵素活性を有する物質を検出すべきである液体試料とは、主として水溶液である。これらの溶液は例えば水中の加水分解酵素の溶液である。しばしば、これらの溶液に混合物、例えば塩、界面活性剤等を、例えば肝臓安定性を高めるために、添加することができる。この種の溶液中に本発明による化合物を使用することもできる。液体試料は体液又はそれから成分を添加又は分離後に得られる液体であつてよい。これには例えば、血液、血しょう、血清又は尿が属す。

液体試料は有利には、免疫学的試験法の経過中に生成するような液体であつてもよい。これらは、例えば、アナルス オブ クリニカル バイオケミストリー (Annals of Clinical Biochemistry) 第16巻、221頁(1979年)に記載されているもの及びその有利な発見物であり、これらは免疫分析の分野の専門家に

公知である。この種の液体中で加水分解酵素活性を有する物質を本発明による方法で検出することができる。これらの溶液は多くの場合に、検出に重大な障害を引き起こさないような緩衝物質、安定化剤、湿潤剤等を含有する。

加水分解酵素活性を有する物質の濃度は、有利には $10^{-6} \sim 10^{-10}$ モル/l、有利には $10^{-6} \sim 10^{-12}$ モル/l の範囲で測定することができる。

この方法は、pH 値が 5 ~ 11、有利には 6 ~ 10 である試料溶液に好適である。方法が実施される最適 pH 値は、使用される加水分解酵素に左右される。方法は迅速に行うために、加水分解酵素が最高活性を有するような pH 値でか又はその近くで実施するのが有利である。この範囲の外では著しい非酵素的加水分解又は加水分解酵素の不活性化が起こりうる。

検出反応は有利には吸収性又は膨潤性支持体で行われる。

この種の支持体は例えばフリース又はフィル

度は高められる。

指示薬反応の間に色を発現させるために、酸化剤の存在が必要である。酸化剤としては、その酸化ポテンシャルが式Ⅱの遊離された化合物の値より上であるような物質又は物質混合物を使用することができる。例えば、ヘキサシアノ鉄(Ⅱ)カリウム、過ホウ酸塩/ペルオキシダーゼ、過酸化物/ペルオキシダーゼ、テトラゾリウム塩又は酸/ピリルビンオキシダーゼが特に有利であると実証された。

本発明による方法を実施するために、試料を、加水分解酵素基質としての少なくとも 1 種類有利には 1 種類の、式Ⅰの化合物及び酸化剤と混合する。

試料と加水分解酵素基質との混合は種々の方法で行うことができる。

試料を加水分解酵素基質及び酸化剤と混合することは、同時に行つても、順次行つてもよい。

液体試料、例えば加水分解酵素活性を有する物質の溶液の場合には、加水分解酵素基質又は

ムである。フリースが有利である。フリースとは、繊維から成る紙状の材料である。繊維材料としては、有利にはセルロース、プラスチック又はその混合物が使用される。スポンジ状又は/及び多孔性支持体も好適である。

しかし、検出反応は任意の容器中で、例えばキューベット中で実施することもできるし、微量滴定プレート上でも行うことができる。反応経過を吸光光度計により追跡すべきである場合には、反応媒体中に可溶性である生成物を形成するような式Ⅰの化合物が特に好適である。一つの方法は、反応媒体の極性により 1 個又は数個の極性基、例えば 1 個のカルボキシル-又はスルホ基を有し、それらの基が強力な親油性特性を有さない、式Ⅰの化合物を使用することである。溶液中の加水分解酵素活性を有する物質を検出するためのその他の方法は、反応媒体の極性を低下させる溶液、例えば有機溶剤を添加することである。これらの付加的な成分の欠点を甘受することによつて、加水分解生成物の溶解

酸化剤を固体、例えば粉末、錠剤、凍結乾燥物等の形でか又は試料の溶液の形で添加することができる。

検出反応が吸収性又は膨潤性支持体で行われる場合には、試料を、その上に加水分解酵素基質並びに場合により酸化剤及び添加剤を含浸させてある支持体上に載せるのが特に有利であると実証された。含浸させるために、前記物質の溶液を製造し、それを支持体材料に含浸させる。引き続き、含浸させた支持体材料を乾燥させる。

支持体がフィルムである場合には、有利には加水分解酵素基質並びに場合により酸化剤及び添加剤をその製造の時に既にフィルム中に組み入れる。

酸化剤が加水分解酵素基質と一緒に存在しない場合には、酸化剤を、試料を加水分解酵素基質と混合する前又はその後に試料と混合する。

後反応が容器中で起こる場合には、加水分解酵素基質を固体又は溶液として、場合により酸化剤及び添加剤と混合して使用することが有利

であると実証された。この場合にも酸化剤又は添加剤を別々に添加することができる。

固体の試料の場合に、例えば加水分解酵素活性を有する物質が支持体材料と結合している場合には、加水分解酵素基質又は／及び酸化剤を試料に溶液の形で添加することが有利である；しかし、例えば成分を先ず混合し、次いで液体を溶液を製造するために添加することもできる。

検出法の結果に重要なのは、加水分解酵素基質を試料中に存在する加水分解酵素活性を有する物質と酵素反応が起こるように接触させることである。

指示薬反応の間に、置換の型により赤から青に及ぶ強力な色が生じる。その色強度は公知方法により光度計、特に反射光度計を用いて測定することができる。その際、指示薬反応の生成物が吸収することができる波長の光を照射する。500～700 nm、特に520～680 nmの波長が有利である。

色強度を、加水分解酵素活性を有する公知濃

本発明による方法は、特に有利な利点を有する試験支持体に使用することができる。例えば、方法が簡単で安価であり、しかも確実な結果を生じることには有利である。方法は例えば、視覚によつても評価できることにより簡単であり；これによつて高価な装置が省かれる。試験支持体上でブリード現象が起きないので、特に正確である。これは非常に有利である。

試験支持体とは、この試験の実施による物質を検出する物体である。この試験支持体は一般に主として、その上に試験に必要な試薬を大抵はフリース又はフィルムにより塗布されている基盤プレート又はシートから成る。

本発明の方法では、有利にはその他のカップリング成分、例えばジアゾニウム塩を使用しない。それは、これらが副反応を生じるか又は安定性を失わせることになるからである。発色には式1の化合物だけが関与する。これによつて、2つの化合物の間の縮合過程で生じる欠点及びインドール型の化合物で存在するような欠点が

度の物質を含有する試料に関して値を測定することによつて得られた検量線の値と比較し、各々の強度を特定の濃度に対応させる。この比較は有利にはコンピューターを用いて行う。

しかし、色の変化ではなく、色発現を観察すべきであるので、肉眼で評価することも可能である。このことは、装置を使用しなくともよいという利点を有する。即ち、誤謬の虞の可能性、例えば装置の操作ミス等も無くなる。

本発明による方法は、加水分解酵素活性を有する物質の定性検査に使用することもできるし、定量検査に使用することもできる。定性評価のために、変色が生じたか否かを観察する。定量測定には、特定の時点で色を、各々の色が特定の濃度に対応している色段階と視覚により比較する。

本発明による加水分解酵素基質を使用する場合に、特に強力に発色する化合物が生じる。置換の型に依り、青から赤の色を有する化合物が得られる。これにより大きな使用分野が生じる。

回避される。

免疫学的試験法には、特に、加水分解酵素活性を有する物質の含量を調べるべきである加水分解酵素複合体の試料も使用される。

本発明による方法は特に、加水分解酵素活性を有する物質を検出するために、従つて例えば分析物を検出するために免疫学的方法で使用することができる。この種の方法は免疫分析の分野の専門家に公知である〔例えば、アナルズオブ クリニカル ケミストリー (Annals of Clinical Chemistry) 第16巻、221頁 (1979年)〕。この方法は、加水分解酵素で標識付けした免疫学的に活性の化合物を本発明による方法を用いて実施するというふうに変更される。下記の例に付き詳説する：

分析物が抗原又はハプテンである場合には、下記の方法が挙げられる：

- 分析物を含有する試料溶液に分析物に対する抗体及び加水分解酵素から成る過剰の複合体を加える。分析物及び複合体から成る免疫複合体

が生じる。過剰の複合体は免疫反応により、過剰の分析物又は分析物類似化合物と結合している支持体と結合される。加水分解酵素及び免疫複合体から成る複合体を含有する溶液を支持体から分離し、本発明による方法により処理する。加水分解酵素複合体に関する実験結果が得られ、これから、分析物の存在又は量を推測することができる。その他の可能性は、支持体と結合した、加水分解酵素及び抗体から成る複合体の検出である。これも本発明による方法により可能である。

- 分析物を含有する試料溶液に、分析物に対する抗体及び加水分解酵素から成る過剰の複合体を加える。分析物及び複合体から成る免疫複合体が生成される。過剰の複合体は免疫反応により、分析物に対する過剰のその他の抗体が結合している支持体と結合される。加水分解酵素及び抗体から成る過剰の複合体を含有する溶液を支持体から分離し、本発明による方法によつて、支持体と結合した免疫複合体及び加水分解酵素

存在又は量を推論することができる。これは例えば、検量線を用いて行うことができる。

更に、加水分解酵素活性を有する物質を検出するための本発明による方法を、核酸の検出法に使用することができる。この種の方法は、核酸ハイブリッド化試験の分野の専門家に公知である。この試験で、その量が検出すべき核酸の濃度の尺度である。一本鎖又は二本鎖の核酸、特に DNA 又は RNA 又は酵素標識付けとして加水分解酵素と結合しているフラグメントが検出される。この加水分解酵素標識付けされた核酸の検出は、加水分解酵素活性を有する物質を検出するための本発明の方法により、有利に行われる。

この新規免疫学的方法及び核酸を検出するための新規方法の利点は、加水分解酵素活性を有する物質を検出するための本発明の方法の利点から明らかである。

本発明のもう1つの目的物は、少なくとも1種類の式Iの化合物を含有する加水分解酵素活

から成る複合体又は溶液中に含有される抗体及び加水分解酵素から成る複合体を検出する。

- 分析物を含有する試料溶液に、公知量の分析物又は分析物類似物及び加水分解酵素から成る複合体を加える。混合物を支持体(これに分析物及び複合体から成る合計に対して公知の不足の分析物及び分析物類似物に対する抗体が結合している)上に載せる。分析物及び複合体の一部は、支持体に結合される。本発明の方法によれば、溶液の分離後、支持体に結合したか又は溶液中に存在する複合体を検出することができる。

分析物が抗体である場合には、同じ原理を使用することができるが、その場合には前記方法における抗体の代わりに、抗原又はこの抗体に対応する抗体を使用すべきである。

分析物を検出するための免疫学的方法では、本発明の方法による加水分解複合体の検出に引き続いて評価を行う。検出された加水分解酵素複合体の存在からか又はその量を定量的に評価する際に、最初に使用した試料中の分析物の存

在を有する物質の検出剤である。この種の検出剤は、前もつてか、同時に又は次の工程で酸化剤を添加される試料中の加水分解酵素活性を有する物質の検出に好適である。

式Iの化合物少なくとも1種類及び酸化剤を含有する加水分解酵素活性を有する物質の検出剤が有利である。

更に、この検出剤は、本来の検出反応には必要ではないが、有利な作用を生じる添加剤を含有することができる。これには特に、検出反応を一定のpH値で行うことができるようにするpH緩衝物質が属する。同様に支持体材料の均一な湿潤を惹起する湿潤剤及び清浄剤が包含される。

本発明による検出剤は有利には一種又は数種の吸収性又は膨潤性の支持体を含有する。この種の支持体は、例えば、フリース又はフィルム、有利にはフリースである。スポンジ状又は多孔性支持体も好適である。

この検出剤は有利には、この上に加水分解酵素及び酸化剤が一緒に又は別々に含浸させてある

か又はフィルムの場合には組み込んである、一種又は数種の吸収性又は膨潤性支持体を含有する。この種の検出剤の製造は自体公知の方法により行われる。

本発明による検出剤は、例えば加水分解酵素及び酸化剤並びに場合により存在する添加物の他に溶剤も含有する。有利な溶剤は水である。この場合でも、加水分解酵素基質及び酸化剤は一緒にか又は別々に溶液として存在してもよい。

本発明による検出剤は、一種又は数種の粉末又は粉末混合物の形で存在してもよい。加水分解酵素基質及び酸化剤の他に、この種の検出剤は、有利には常用の不活性の可溶性ガレックス填料、例えばポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール等を含有することができる。粉末又は粉末混合物を圧縮成形して錠剤にすることもできる。

この種の検出剤は、加水分解酵素活性を有する物質の検出法に使用するために好適である。

本発明のその他の目的は、式 I の化合物を試

料中の加水分解酵素活性を有する物質を検出するための前記方法に使用することである。

次に本発明を実施例につき詳説する。

例 1

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) 1 - H - イミダゾール - 2 - イル] - 2 - メトキシフェノール - ヒドロクロリド

氷酢酸 400 ml 中の 4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシベンズアルデヒド (バニリン) 30.4 g (0.2 モル) の溶液を 1 - (4 - ジメチルアミノフェニル) プロパンジオン - 1, 2 38.24 g (0.2 モル) 及び酢酸アンモニウム 15.4 g (2 モル) と一緒に 3 時間遡流下で加熱し、その後、氷冷却下で濃アンモニア 1.1 l 中に注入する。得られた粗生成物を酢酸エステル中に入れ、水と一緒に十分に振り、溶剤を硫酸ナトリウム上で乾燥後、真空中で濃縮する。残分をエタノール中に溶かした後、5 N のエーテル性塩酸の添加により塩酢塩を沈降させ、これをイン

プロパノール - 水 3 : 1 から再結晶させることによつて精製する。標題化合物の無色結晶 58 g (81 %) が得られる。融点 $> 200^{\circ}\text{C}$ (分解)
 $\text{M B} : \text{m/e} = 323$ (塩基)。

H_2O_2 / POD を用いるロイコ化合物の酸化により
 \rightarrow 発色体 $\lambda_{\text{max}} 693 \text{ nm}$ 、 $\epsilon = 19500$

DC (シリカゲル 60、酢酸エステル) : 0.27

例 2

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) オキサゾール - 2 - イル] - 2 - メトキシフェノール

a) 4 - N, N - ジメチルアミノ - α [(4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシ) - ベンザイルオキシ] - プロピオフェノン

4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシ安息香酸ナトリウム 4.5 g (0.024 モル) を DMF 50 ml 中に懸濁させ、4 - N, N - ジメチルアミノ - α - プロムプロピオフェノン 8 g (0.03 モル) を添加し、6 時間遡流下で加熱する。真空中で濃縮した後、残分をシリカゲルカラム (シリカ

ゲル 60 ; $\phi 3 \text{ cm}$ 、充填高さ 26 cm) のクロマトグラフィーにかける (溶離剤 : n - ヘプタン / メチルエチルケトン 2 / 1)。標題化合物 3.5 g (42.5 %) が得られる。融点 $151 / 154^{\circ}\text{C}$ 。

b) 4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) - オキサゾール - 2 - イル] - 2 - メトキシフェノール

2 a で得られた生成物を氷酢酸 18 ml 中の酢酸アンモニウム 4.2 g (0.054 モル) と一緒にアルゴン化で 3 時間、遡流下で加熱し、冷却する際に着色した生成物が得られ、これを水 50 ml と攪はんし、吸引濾過し、五酸化二磷を用いて乾燥させた後、標題化合物 3.1 g (94.5 %)、融点 $170 \sim 173^{\circ}\text{C}$ 、が得られる。

DC : (シリカゲル 60 - F 254、溶離剤 : トルエン / メタノール 5 / 1)

$R_F = 0.31$ 、 $\text{M B} : \text{m/e} 324$

H_2O_2 / POD を用いる酸化後、 $\lambda_{\text{max}} 542 \text{ nm}$ 、 $\epsilon = 14558$

例 3

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) - チアゾール - 2 - イル] - 2 , 6 - ジメトキシフェノール

a) 4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) - チアゾール - 2 - イル] - 2 , 6 - ジメトキシフェノール - ベンジルエーテル

4 - ベンジルオキシ - 3 , 5 - ジメトキシ - フェニルチオアセトアミド 7.4 g (0.024 モル) を無水エタノール 240 ml 中に溶かし、4 - ジメチルアミノ - α - プロムプロピオフェノン 6.2 g (0.026 モル) を加え、6 時間還流下で加熱する。吸引濾過し、反応生成物を無水エタノールで洗浄した後、ベンジルオキシ化合物 8.5 g (7.6 %)、黄色結晶、融点 50 ~ 53 °C、が得られる。

DC (シリカゲル 60 - F254、トルエン / 酢酸エステル 5 : 1 - 均一)

b) 4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) - チアゾール - 2 - イル] - 2 , 6 - ジメトキシフェノール

生成した結晶を吸引濾過し、濾過器残分を氷冷エタノールで洗浄し、得られた晶状酢酸塩を 40 °C で乾燥箱中で乾燥させる。標題化合物の淡黄色結晶 3.23 g (8.2 %) が得られる。

融点 253 ~ 256 °C、MB : m/e = 365
DC : (シリカゲル 60 F254 - 塩化メチレン / メタノール 5 / 1 - RF = 0.77)

同様にして次のものが製造される：

例 4 a

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) - オキサゾール - 2 - イル] - 2 - メトキシフェニルアセテート

MB : m/e = 366、融点 97 / 102 °C、収率 75 %

DC : (シリカゲル 60 F-254 - トルエン / メタノール 5 / 1) : RF = 0.36)

例 4 b

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) - チアゾール - 2 - イル] - 2 , 6 - ジメトキシフェニルアセテート

ル) - 5 - メチル) - チアゾール - 2 - イル] - 2 , 6 - ジメトキシフェノール

3 a で得られた 0 - ベンジルエーテルをメタノール 300 ml 中に加熱下で溶かし、還流煮沸下で 2 時間塩化水素ガスを導入する。冷却する際に、黄色の結晶 3 b、5.9 g (88.2 %) が晶出する。

融点 230 ~ 233 °C。

MB : m/e = 370

H₂O₂ / POD を用いる酸化後、 λ_{\max} 564 nm、

$\epsilon = 7687$

例 4

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル] - 2 - メトキシフェニルアセテート

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル] - 2 - メトキシフェノール - ヒドロクロリド 3.5 g をピリジン 200 ml 中に溶かし、無水酢酸 20 ml を滴加し、1 時間室温で攪はんし、

MB : m/e = 412、融点 247 ~ 249 °C、収率 73 %

DC : (シリカゲル 60 - F 254 - トルエン / 酢酸エステル 5 / 1)

RF = 0.34

例 4 o

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル] - 2 , 6 - ジメトキシフェニルアセテート

MB : m/e = 395、融点 > 250 °C、

収率 : 78 %

DC : (SiO₂-60-F 254 - トルエン - メタノール 5 : 1) RF = 0.19

酵素分解及び引き続く K₃[Fe(ON)₆] を用いる酸化 →

発色体 : λ_{\max} 680 nm、 $1g\epsilon = 4.4$

例 4 d

4 - [4 , 5 - ビス (4 - ジメチルアミノフェニル) 1 H - イミダゾール - 2 - イル] - 2 , 6 - ジメトキシフェニルアセテート

M B : m/e = 500、融点 261~262℃、
収率 : 72%

D C : (シリカゲル 60-F 254 : クロロホルム/
テトラヒドロフラン 1/1) : R F = 0.81
酵素分解及び引き続く $K_3[Fe(ON)_6]$ を用いる酸
化 ---

発色体 : λ_{max} 643 nm、 $lg \epsilon = 4.36$

例 5

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル)
- 5 - メチル) - 1 - H - イミダゾール - 2 - イ
ル] - 2 - メトキシ - ドデカノエート
4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル)
- 5 - メチル) - 1 - H - イミダゾール - 2 -
イル] - 2 - メトキシ - フェノール 1.6 g
(0.005 モル) を無水ピリジン 20 ml 中に溶
かし、10分以内にドデカン酸クロリド 9.8 g
3.6 ml (0.01 モル) を撹はん下で滴加する。
1時間更に撹はんした後、水 50 ml を添加し、
酢酸エステル各々 50 ml で2回抽出する。硫酸
ナトリウムを用いて乾燥させ、溶剤を蒸発除去

M B : m/e = 393、融点 62~64℃、
収率 : 63%
D C : (シリカゲル 60 F 254 - トルエン/
酢酸エステル 1/1、R F = 0.33

例 5 a

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) -
5 - メチル) - 1 - H - イミダゾール - 2 - イ
ル] - 2 - メトキシフェニル - ペンタノエート
M B : m/e = 407、無定形、収率 : 72%
D C : (シリカゲル 60-F 254 - トルエン/
酢酸エステル 2/1、R F = 0.18

例 5 d

4 - [4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) -
5 - メチル) - 1 - H - イミダゾール - 2 - イ
ル] - 2 - メトキシフェニル - オクタノエート
M B : m/e = 449、融点 126~129℃、
収率 : 78%
D C : (シリカゲル 60-F 254 - トルエン/
酢酸エステル 1/1) : R F = 0.44

例 6

した後、粗生成物をカラムクロマトグラフィー
で精製する。(SiO_2 、トルエン/酢酸エステル
1:1)。標題化合物のページユ色の結晶 1.3 g
(48%) が得られる。

M B : m/e = 505、融点 110~112℃。
D C : (シリカゲル 60-F 254 - トルエン/
メタノール 5/1) R F = 0.34、

同様にして次のものが製造される :

例 5 a

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) -
5 - メチル) - 1 - H - イミダゾール - 2 - イ
ル] - 2 - メトキシフェニル - プロパノエート
M B : m/e = 379、融点 244~246℃、
収率 56%
D C : (シリカゲル 60 F - 254 - トルエン/
酢酸エステル 1/1) R F = 0.31

例 5 b

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル)
- 5 - メチル) - 1 - H - イミダゾール - 2 - イ
ル] - 2 - メトキシフェニル - ブタノエート

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル)
- 5 - メチル) - 1 - H - イミダゾール - 2 - イ
ル] - 2 - メトキシ - ジヒドロゲンフオスフ
エート

ピリジン 20 ml 及びオキシ三塩化磷 6 ml

(0.065 モル) の混合物に10分間以内にピ
リジン 20 ml 中の 4 - [(4 - (4 - ジメチル
アミノフェニル) - 5 - メチル) - 1 - H - イ
ミダゾール - 2 - イル] - 2 - メトキシ - フェ
ノール 3.2 g (0.01 モル) の溶液を滴加し、
その際、温度は約 30℃ に上昇する。3時間室
温で撹はんし、室温で2時間放置した後、生成
した結晶を吸引濾過し、水で洗浄し、粗生成物
を五酸化二磷を用いて乾燥させる。イソプロパノ
ール/ n - ブチルアセテート/水/アンモニア
50:30:15:5 を用いるシリカゲル 60
のカラムクロマトグラフィーによる精製(カラ
ム : 充填高さ 84 cm ϕ 2.5 cm) により、標題
化合物が得られる。

M B : m/e = 403、融点 226/230℃。

D O : (シリカゲル 60 F254-n-プロパノール/酢酸エステル/H₂O/酢酸 60:10:30:5、 $R_F=0.51$)

同様にして次のものが製造される:

例 6 a

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) - 1 - H - イミダゾール - 2 - イル] - 2, 6 - ジメトキシフェニル - ジヒドロゲンホスフェート

M B : m/e = 433、融点 196 ~ 198 °C、収率 35 %

D O : (シリカゲル 60-F254、塩化メチレン/メタノール 75/75) 均一。

例 6 b

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - フェニル) - 1 - H - イミダゾール - 2 - イル] - 2, 6 - ジメトキシフェニル - ジヒドロゲンホスフェート

M B : m/e = 495、融点 230 / 235 °C、収率: 28 %

例 7

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) - オキサゾール - 2 - イル] - 2 - メトキシフェニル - ジヒドロゲンホスフェート

a) 4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル - 5 - メチル) - オキサゾール - 2 - イル] - 2 - メトキシフェニルジベンジルオキシホスフェート

4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) - オキサゾール - 2 - イル] - 2 - メトキシフェニル 3.24 g (0.01 モル) を無水テトラヒドロフラン 40 ml 中に懸濁させ、四塩化炭素 2 ml を添加し、油浴中で 40 °C に加熱すると、その際、オキサゾールは完全に溶液になる。その後、順次磷酸ジベンジル 6 ml 及びトリエチルアミン 4 ml を 5 分間以内に滴加する。5 時間室温で攪はんし、生成した塩化トリエチルアンモニウムを吸引濾過し、濾液を真空中で減縮する。得られた粗生成物をカラムクロマト

が下記から得られる:

例 1 のような相応するジケトンからの 4 [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - フェニル) - 1 - H - イミダゾール] - 2, 6 - ジメトキシフェニルから、

M B : m/e 410、融点 181 °C (分解)
 λ_{max} (H₂O₂ / POD を用いる酸化後) 680 nm。
 $1g^* = 4.3$

例 6 c

4 - [4, 5 - ビス (4 - ジメチルアミノフェニル) - 1 - H - イミダゾール - 2 - イル] - 2, 6 - ジメトキシ - ジヒドロゲンホスフェート

M B : m/e = 538、融点 258 ~ 260 °C、収率: 45 %

4 - [(4, 5 - ビス (4 - ジメチルアミノフェニル) - 1 - H - イミダゾール - 2 - イル] - 2, 6 - ジメトキシフェニル (KODAK) から、
 λ_{max} (H₂O₂ / POD を用いる酸化後) 643 nm
 $1g^* = 4.4$

グラフィーにより精製する (シリカゲル 60 カラム 1.1 m、 ϕ 3 cm - トルエン / メタノール 20/1)。

b) 4 - [(4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル) - オキサゾール - 2 - イル] - 2 - メトキシフェニル - ジヒドロゲンホスフェート

a) からの化合物 1 g をメタノール 8 ml 及びジオキサン 8 ml の混合物中で、PdO 0.06 g の添加下で 4 時間半室温で加水分解する。その後、最終生成物をカラムクロマトグラフィーにより精製し、標題化合物 0.8 g (19.8 %)、黄色油状物が得られる。

M B : m/e = 404、無定形、
D O : (シリカゲル 60-F254-n-プロパノール/酢酸エステル/水/トルエン/氷酢酸 60/10/30/5/2) : $R_F=0.74$ 。

例 7 c:

4 [(4, 5 - ビス (4 - ジメチルアミノフェニル) オキサゾール - 2 - イル] - 2, 6 - ジ

メトキシフェニル-ジヒドロゲンホスフェート
 $M_B: m/e = 539$ 、融点 $195/200^\circ\text{C}$
 4〔(4, 5-ビス(4-ジメチルアミノフェニル)オキサゾール-2-イル)-2, 6-ジメチルオキシフェノールから。

$M_B: m/e = 459$ 、融点 218°C
 $\lambda_{\max}(\text{H}_2\text{O}_2/\text{POD}$ を用いる酸化後、) 555nm 、
 $\lg \epsilon = 3.85$

例 8

4-(4-(4-ジメチルアミノフェニル)-5-メチル)-1H-イミダゾール-2-イル)
 2-メトキシフェニル)-2-(アセトアミド)-
 2-デオキシ- β -D-グルコピラノシド
 a) 2〔4-(2-アセトアミド-2-デオキシ-3, 4, 6-トリアセチル- β -D-グルコピラノシルオキシ)-3-メトキシフェニル)-5-メチル)-4(4-ジメチルアミノフェニル)-1, 3-イミダゾール($M_B=651$)

水200ml中の α -ブチルトリエチルアンモニウムブロミド7g(0.025モル)の溶液に、

クロロホルム200ml中の4-〔(4-(4-ジメチルアミノフェニル)-5-メチル)-1H-イミダゾール-2-イル)-2-メトキシフェノール5.9g(0.0164モル)の溶液、更に1-クロル-2-デソキシ-2, 3, 4, 6-テトラアセチル- β -D-グルコスサミン14.2g(0.039モル)及び炭酸カリウム13.9g(0.102モル)を添加する。強力に攪はんしながら4時間還流下で煮沸する。冷却後、クロロホルム相を分離し、溶剤を真空中で濃縮する。得られた粗生成物をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーにより精製する(溶離剤-塩化メチレン/メタノール1:1)。テトラアセチル化合物4.4g(41.1%)が得られる。

b) (4-(4-(4-ジメチルアミノフェニル)-5-メチル)-1H-イミダゾール-2-イル)-2-メトキシフェニル)-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシド

8 a) で得られた生成物を脱アセチル化するために、これをメタノール300ml中に溶かし、炭酸水素ナトリウム20gの添加後に3時間30℃で攪はんする。無機物質を吸引濾過した後、溶剤を濃縮し、最終生成物をシリカゲル60、溶離剤:トルエン/メタノール1:1を用いるカラムクロマトグラフィーにより後精製する。D.O.-均一な生成物3.1g(36%)が得られ、氷冷メタノールと一緒に攪はんした後、疎塩化合物1.8g(21%)が得られる。

$M_B: m/e = 525$ 、融点 181°C

D.O.: (シリカゲル 60F254、トルエン/氷酢酸/メタノール1:1:1) $R_F = 0.21$ 。

この化合物は、pH6及びpH9でH-アセチル- β -D-グルコースアミニダーゼ用の非常に良好な基質となる(強力な青色着色)。

例 9

2-(4- β -D-ガラクトピラノシルオキシ-3-メトキシフェノール)-5-メチル-4-(4-ジメチルアミノフェニル)-1, 3-イ

ミダゾール

a) 2〔(4-(テトラ-O-アセチル- β -D-ガラクトピラノシルオキシ)-3-メトキシフェニル)-5-メチル-4-(4-ジメチルアミノフェニル)-1, 3-イミダゾール

氷酢酸(200ml)中の(4-ホルミル-2-メトキシフェニル)2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- β -D-ガラクトピラノシド〔R.G. プライス(Price)その他、クリニカヒエミカ アクタ (Clinica Chemica Acta) 第124巻(1982年)195~204頁; 4.8g、10モル〕、1-(4-ジメチルアミノフェニル)プロパンジオール-1, 2(1.9g、10ミリモル)及び酢酸アンモニウム(7.7g、100ミリモル)の溶液を1時間125℃に加熱する。引き続き、氷/水上に注ぎ、沈澱を吸引濾過し、乾燥させる。カラムクロマトグラフィーによる精製後(SiO_2 ; トルエン/酢酸エステル/メタノール=4:4:1)、融点163~168℃、 m/e 653(M^+)の疎塩化合物4.2g

(65%) が得られる。

b) 2 - (4 - β - D - ガラクトピラノシルオキシ - 3 - メトキシフェニル) - 5 - メチル - 4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) 1, 3 - イミダゾール

メタノール (30 ml) 中の a で得られた化合物 (5 g, 7.6 ミリモル) に 0℃ で 1 N の Na-メチラート溶液 (5 ml) を加える。3 時間後、溶液を弱酸性イオン交換体 [例えばアンバーライト (Amberlite) IRO 50、H⁺ - 形] で処理し、濾過し、濃縮する。残分をエーテル/石油エーテルで浸漬し、濾別する; 収量 2.7 g (73%); 融点 140℃ (沸騰下)。

MS (neg. FAB) m/e = 484

DC: (シリカゲル 60、イソプロパノール/メタノール 1/1) RF = 0.4。

例 10

2 - (4 - β - D - ガラクトピラノシルオキシ - 3 - メトキシフェニル) - 4, 5 - ビス (4 - ジメチルアミノフェニル) - 1, 3 - イ

酢酸エステル/メタノール = 2 : 2 : 1); 収量 0.77 g (77%); 融点 174 ~ 182℃。

例 11

同様にして 2 つの反応工程で、例 10 に記載したようにして、次に記載のイミダゾール誘導体が得られた。最初の工程で、相応する過アセチル化された (4 - ホルミルフェニル) - β - D - ガラクトシド及び相応する 1, 2 - ジケトンから、氷酢酸中で酢酸アンモニウムと反応させることによつて過アセチル化されたガラクトシドを生成し、これを第 2 工程で脱アセチル化する。

a) 2 - (4 - β - D - ガラクトピラノシルオキシフェニル) - 4 - (4 - ジメチルアミノフェニル) - 5 - メチル - 1, 3 - イミダゾール (4 - ホルミルフェニル) - 2, 3, 4, 6 - テトラ - O - アセチル - β - D - ガラクトピラノシド [Z. Ksross (Csuros) その他, Acta Chim. Acad. Sci. Hung, 第 42 巻 (1964 年) 263 ~ 267 頁)、4.5 g、10 モル] 及び

ミダゾール

a) 例 9 と同様にして、(4 - ホルミル - 2 - メトキシフェニル) - 2, 3, 4, 6 - テトラ - O - アセチル - β - D - ガラクトピラノシド [R.O. プライスその他、クリニカ ヒエミカ アクタ第 124 巻 (1982 年) 195 ~ 204 頁; 4.8 g、10 モル]、4, 4' - ビス (ジメチルアミノ) ベンジル (3 g、10 ミリモル) 及び酢酸アンモニウム (7.7 g、100 ミリモル) を氷酢酸 (200 ml) 中で反応させる。18 時間還流下で煮沸し、後処理し、クロマトグラフィーにより精製した後、テトラ - O - アセチルガラクトシル - 誘導体が得られる; 収量 4.7 g (62%)。

b) 脱アセチル化するために、前に得られた生成物 (1.26 g、1.7 ミリモル) をメタノール (150 ml) 中の炭酸水素ナトリウム (1.7 g) の懸濁液で 2 時間 40℃ で処理する。無機沈殿を濾別した後、濃縮し、残分をクロマトグラフィーで精製する (シリカゲル 60、トルエン/

及び 1 - (4 - ジメチルアミノフェニル) プロパンジオン - 1, 2 (1.9 g、10 ミリモル); 反応時間: 2 時間;

テトラ - O - アセチル - β - D - ガラクトピラノシド: 収量: 4.6 g (74%)。

例 10 b) による脱アセチル化; 収率 74%, 融点 177 ~ 187℃。

b) 2 - (4 - β - D - ガラクトピラノシルオキシフェニル) - 4, 5 - ビス (4 - ジメチルアミノフェニル) - 1, 3 - イミダゾール

(4 - ホルミルフェニル) - 2, 3, 4, 6 - テトラ - O - アセチル - β - D - ガラクトピラノシド [Z. Ksross その他, Acta Chim.

Acad. Sci. Hung, 第 42 巻 (1964 年) 263 ~ 267 頁)、4.5 g、10 モル] 及び 4, 4' - ビス (ジメチルアミノ) ベンジル (3 g、10 ミリモル) から;

反応時間: 2 時間;

テトラ - O - アセチル - β - D - ガラクトピラノシド: 収量: 2.2 g (30%)。

例 10 b による脱アセチル化；収率 83%、融点 230~237℃

c) 2-(3-クロル-4-β-D-ガラクトピラノシルオキシフェニル)-5-メチル-4-(4-ジメチルアミノフェニル)-1,3-イミダゾール

(2-クロル-4-ホルミルフェニル)2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノシド[R.G. プライスその他、クリニカ ヒエミカ アクタ第124巻(1982年)195~204頁の指針により、2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-α-D-ガラクトピラノシルプロミド及び2-クロル-4-ホルミルフェニールから製造した]；4.9g、10モル及び1-(4-ジメチルアミノフェニル)プロパンジオン-1, 2(1.9g、10ミリモル)から；

反応時間：2時間、

テトラ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノシド：収量：5.95g(90%)。

例 12

2-(4-β-D-ガラクトピラノシルオキシ-3-メトキシフェニル)-4, 5-ビス(4-メトキシフェニル)-1, 3-イミダゾール

a) 2[(4-(テトラ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノシルオキシ)-3-メトキシフェニル)-4, 5-ビス(4-メトキシフェニル)-1, 3-イミダゾール

氷酢酸700ml中のバニリン-2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノシド[プライスその他、前記文献]14g(29ミリモル)、4, 4'-ジメトキシベンジル7.8g(29ミリモル)及び酢酸アンモニウム13.2g(174ミリモル)から成る溶液を、攪はん下で保護気体雰囲気中で5時間減圧下で煮沸する。引き続き、20℃に冷却させ、トルエンを数回添加して真空中で酢酸を蒸発除去する。粗生成物を更に精製せずに次の合成工程に使用する。D.C.(シリカゲル60、溶離剤 酢酸

例 10 b による脱アセチル化。

d) 2-(3-クロル-4-β-D-ガラクトピラノシルオキシフェニル)-4, 5-ビス(4-ジメチルアミノフェニル)-1, 3-イミダゾール

(2-クロル-4-ホルミルフェニル)2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノシド[R.G. プライスその他、クリニカ ヒエミカ アクタ第124巻(1982年)195~204頁の指針により、2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-α-D-ガラクトピラノシルプロミド及び2-クロル-4-ホルミルフェニールから製造した]；4.4g、9ミリモル及び4, 4'-ビス(ジメチルアミノ)ベンジル(2.7g、9ミリモル)から；

反応時間：6時間；

テトラ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノシド：収量：粗生成物6.9g(これはクロマトグラフィーによる精製なしに、例10aと同様に脱アセチル化を行つた)。

エチル/石油エーテル1/1)：R.F.=0.1。

b) 2-(4-β-D-ガラクトピラノシルオキシ-3-メトキシフェニル)-4, 5-ビス(4-メトキシフェニル)-1, 3-イミダゾール

a) で得られた粗生成物を無水メタノール300ml中に懸濁させ、十分な量の飽和メタノール性ナトリウムメチラート溶液を加え、pH値を12~13にする。20℃で約1時間完全に脱アセチル化するまで攪はんし(D.C.-制御、pH-制御)、溶液を酸性イオン交換体(Dowex 50WX8, H⁺)の添加により中和する。15分後に、イオン交換体を識別し、濾液を真空中で濃縮する。精製はシリカゲルを用いるフラッシュ-クロマトグラフィー(溶離剤：酢酸エチル/メタノール7/3)により行う。D.C.(シリカゲル60、溶離剤：酢酸エチル/メタノール7/3)：R.F.=0.4。収量：4.9g(30%)。M.B.(neg. FAB)：m/e=563。

例 13

2 - (4 - β - D - ガラクトピラノシルオキシ
- 3 - メトキシフェニル) - 4 , 5 - ビス (4
- メチルフェニル) - 1 , 3 - イミダゾール

4 , 4' - ジメチルベンジルを用いて例 1 2 と
同様にして相応するガラクトシドを製造する。

D O (シリカゲル 60、溶離剤：酢酸エチル/
メタノール 7/3) : R_F = 0.5。M B (neg.
FAB) : m/e = 531。

例 1 4

加水分解酵素 - 基質としての適性

点滴試験で種々の化合物の加水分解を相応する
加水分解酵素 (アリールスルファターゼ、酸
性及びアルカリ性ホスファターゼ、エステラー
ゼ、アセチル - β - D - グルコサミダーゼ及
びリパーゼ) により検査した。

その際遊離する塩基を同時にヘキサシアノ鉄
(Ⅱ) カリウム、 $K_3[Fe(CN)_6]$ により酸化して色
素にし、色生成を視覚により評価した。

実施／結果

加水分解速度を pH 6.0 並びに pH 9.0 で加水分

解酵素溶液を基質／緩衝剤／酸化剤／紙上に滴
加することによつて視覚により評価した。

酵素濃度は約 1000 U / ml であり、その際、
試験温度は室温であつた。

比較用に、試料として 0.9 % NaCl 溶液を用
いる非酵素的加水分解を評価した。

相応する遊離塩基の使用により、 $K_3[Fe(CN)_6]$
を用いる酸化可能性を裏付けた。

基質 - 紙の製造

フリース pH 6.0 - 磷酸二水素カリウム 100ミリモル/l
含浸溶液 ヘキサシアノ鉄(Ⅱ)カリウム 10ミリモル/l
プルロニック R_F 68 2%

pH 値を 2N KOH 溶液で 6.0 に調節した。

フリース pH 9.0 - グリシン 100ミリモル/l
ヘキサシアノ鉄(Ⅱ)カリウム 10ミリモル/l
プルロニック R_F 68 2%

pH 値を 2N NaOH 溶液で 9.0 に調節した。

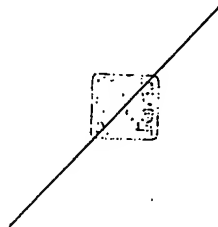
含浸：8 × 30 cm の紙フリース (Whatman 3M)
を含浸溶液 8 ml で含浸させ、30 分間乾燥箱中
で 50℃ で乾燥させた。

こうして含浸させた緩衝剤 - 酸化剤 - 紙を
8 × 2 cm の条片に切り、基質溶液を後含浸させ
た。

基質 - 溶液／含浸溶液：

メタノール 1 ml 中に試験すべき基質 (又は遊
離塩基) 5 mg を溶かすか又は懸濁させ、これを
各々 10 μ l ずつ緩衝剤 - 酸化剤 - 紙上に添加
した。乾燥器を用いて溶剤を蒸発除去した。

次いでこの基質 - 酸化平面上に加水分解溶液
を滴加し、評価した。例 1 から 7 a に記載の化
合物は上記の紙で陽性の結果を示した：



例	酵 素	pH 6	pH 9
4	1	++	+++
4a	1	+++	+++
4b	1	+	++
4c	1	+++	+++
4d	1	++	++
5	1	+	++
5a	1	+	++
5b	1 又は 4	++	+++
5c	1	++	++
5d	1	++	+++
6	2	-	++
6a	2	-	+++
6b	2	++	+++
6c	2	+	++
7b	2	+	++
7c	2	++	+++
8	3	+++	+++

- 酵素 1 豚肝臓からのエステラーゼ
 2 アルカリ性ホスファターゼ
 3 N-アセチル-β-D-グルコースアミダーゼ
 4 リパーゼ

着色 + 着色

++ 強力に着色

+++ 強力かつ迅速に着色

例 1 5

試料中のヒトのコリオンゴナドトロピン (hCG) の検出

A) 支持体の製造 (図 1)

a) フリース 3 の製造

1 枚の紙 [カルフ社 (Firma Kalff) の 4210 型] を条片 (長さ 2.6 cm、幅 0.6 cm) に切断した。DMSO 中の 2-メトキシ-4-[4,5-ビス-(4-メトキシフェニル)-イミダゾール-2-イル]-フェニル-β-D-ガラクトピラノシド (例 1 2 からのガラクトシダーゼ基質) 40 mg/ml の溶液 20 μl を水中のポリビニルアルコール 2.4 % 溶液 20 μl と混合した。

にブロムシアンで活性化した後、マウス抗体の Fc 部に対するヒツジ抗体を固定した。この材料の一片を条片 (長さ 1.1 cm、幅 0.6 cm) に切った。

d) フリース 7 の製造

1 枚の紙片 [ワットマン社 (Firma Whatmann) の D-28 型] を 5 × 0.6 cm の大きさに切った。

e) フリース 3 及び 5 はプラスチックシートにより相互に分かれている。

乾燥させたフリースを幅 0.6 cm の基底シート 2 に貼付けることによつて、図 1 に記載の試験支持体 1 を製造した。その際、フリース 5 は、ポリビニルアルコールで含浸させた端部が試験支持体端部 8 の方向を向くように貼付けた。

B) 試験の実施

a) 試料準備

試料 0.5 ml を、磷酸塩緩衝剤中 (pH 7) の過ホウ酸ナトリウム 4 ミリモル/l 及びオランダガラシ-ペルオキシダーゼ (酸化剤) を含有する溶液 0.5 ml と混合した。

この混合物を紙条片の中央に載せた。

b) フリース 5 の製造

1 枚の紙 [カルフ社の 4210 型] を条片 (長さ 2.6 cm、幅 0.6 cm) に切断した。一方の端部を PBS 緩衝剤 (磷酸塩で緩衝した塩水、pH 7.0、豚血清アルブミン 1 %、トウイーン R 20 0.1 %) 100 μl で含浸した。紙条片の中央に、hCG に対するモノクローナル抗体の Fab-フラグメント及び β-ガラクトシダーゼ (ガラクトシダーゼ活性を有する物質) から成る複合体 20 U/ml、hCG の β 鎖に対するモノクローナルマウス-抗体 100 μg/ml 及び 4-アミノベンジル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド 7.5 mg/ml を含有する溶液 7.5 μl を載せた。緩衝剤を含浸させた端部と反対の端部に水中のポリビニルアルコールの 5 % 溶液 10 μl を含浸させた。

c) フリース 6 の製造

1 枚の紙片 [シュライヒャー & シュル社 (Firma Schleicher & Schull) の 3512 型]

b) 試料の試験条片への施与

試験条片 1 の端部 8 を溶液に入れた。hCG を含有する溶液はフリース 5 及びフリース 3 に浸透し、その上に存在する物質を溶かした。hCG と、hCG に対するモノクローナル抗体の β-ガラクトシダーゼで標識付けされた Fab-フラグメント及び hCG の β-鎖に対するモノクローナル抗体との反応により、フリース 5 の溶液中に β-ガラクトシダーゼ標識付けされた 3 つの成分から成る免疫複合体が生成した。次いで、この場合に加水分解酵素活性を有する物質であるこの免疫複合体を、本発明による方法を用いてフリース 6 で検出する。免疫複合体を有する溶液は、基質を有する溶液と全く同様にフリース 3 からフリース 6 中に浸透し、そこでこの基質溶液と混合させられた。フリース 6 で、生成された免疫複合体並びに hCG の β-鎖に対する過剰のモノクローナル抗体は、固定されたヒツジ抗体を介してフリース 6 と結合させられた。場合により過剰の β-ガラクトシダーゼ標識付け

された Fab - フラグメントは更にフリース 7 中に流入した。結合された免疫複合体の β - ガラクトシダーゼ標識付けにより及び酸化剤を用いて、10 分間以内にフリース 6 で赤色着色が生じた。

hCG が全く試料中に含有されていない場合には、 β - ガラクトシダーゼ標識付けされた免疫複合体も全く生成されなかつた。従つて、加水分解酵素活性を有する物質は全くフリース 6 で結合されず、従つて発色は全く見られなかつた。これに対して、 β - ガラクトシダーゼ標識付けされた Fab - フラグメントは全量なお溶液中に含有されており、これはフリース 7 中に浸透する。従つて、 β - ガラクトシダーゼ標識付けされた Fab - フラグメント（これも加水分解酵素活性を有する物質である）の反応により惹起されたフリース 7 で発色が観察される。従つて、試験の対照は、フリース 7 でも本発明による方法が実施されることによつて、行われる；これは特に、試料中に hCG が全く存在しなかつた場

合に重要である。

オール - 2 - イル） - フェニル - β - D - ガラクトピラノシド（例 12）を含浸させたフリースである。

d) フリース 13 は試料施与に役立つ。

試験支持体 11 を製造するために、図 2 に記載のフリースを基盤シート 12 上に固定した。

B) 試験実施

a) 試料準備

試料は例 15 と同様にして準備した。

b) 実施

試験条片 11 の端部 17 を溶液に入れた。

T4 を含有する試料はフリース 13 中に浸透した。そこから更にフリース 14 中に流入し、そこで β - ガラクトシダーゼ - 複合体を溶かした。抗体と T4 との免疫反応によつて、 β - ガラクトシダーゼ標識付けされた免疫複合体が生成された。この免疫複合体の他になお過剰の β - ガラクトシダーゼ複合体を含有する溶液は、フリース 15 中に侵入した。そこでこの過剰分は結合した T4 を介して紙と結合した。

合に重要である。

試料中に hCG が多く存在すればするほど、従つてフリース 6 中に結合した β - ガラクトシダーゼで標識付けされた免疫複合体が多く存在すればするほど、それだけ強力な着色がフリース 6 で 10 分間の経過後に見られるので、評価は定量的にも行われる。

例 16

チロキシン (T4) の検出

A) 試験条片 11 (図 2) の製造

a) フリース 14

フリース 14 は β - ガラクトシダーゼと T4 に対する抗体の複合体で含浸してある。

b) フリース 15

1 枚の紙片〔シュライヒャー & シュル社の 3512 型〕にプロムシアンで活性化し、それに T4 スクシンイミドエステルを結合させた。

c) フリース 16

フリース 16 は、2 - メトキシ - 4 - [4, 5 - ビス - (4 - メトキシフェニル) - イミダ

なお免疫複合体を含有する溶液は、フリース 16 中に侵入した。そこで本発明による β - ガラクトシダーゼで標識付けされた免疫複合体（これは加水分解酵素活性を有する物質である）の検出方法が行われる。溶液中この錯体が多く存在すればするほど、従つて溶液中に T4 が多く含有されていればそれだけ、より強力にフリース 16 が 10 分後に赤色に着色した。T4 が存在しない場合には、フリース 16 は白色のままである。

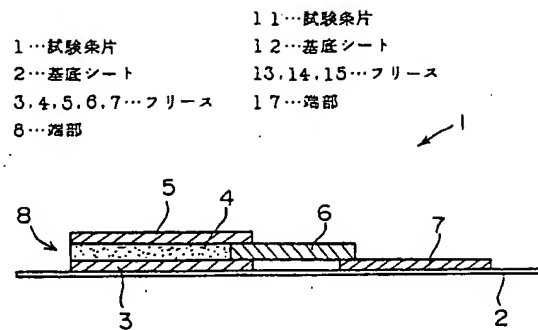
4 図面の説明

第 1 図は本発明による試験条片の断面図であり、第 2 図は本発明によるもう 1 つの態様の試験条片を示す断面図である。

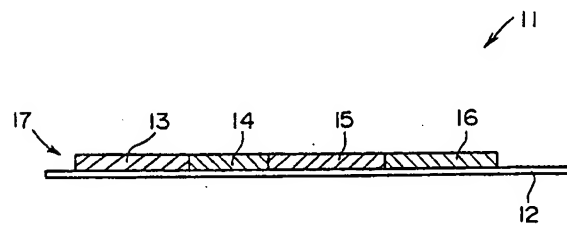
1...試験条片、2...基盤シート、3, 4, 5, 6, 7...フリース、8...端部、11...試験条片、12...基盤シート、13, 14, 15, 16...フリース、17...端部

代理人 弁理士 矢野 敏 雄





第1図



第2図

第1頁の続き

⑤Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

C 07 D 277/34
C 07 F 9/6506
9/653
9/6539
C 12 Q 1/00
1/34

C

7431-4C
8619-4H
8619-4H
8619-4H
6807-4B
6807-4B

- ⑦発明者 ヴエルナー・ギユート ドイツ連邦共和国マンハイム24・イム・ゼンタイヒ 31
ライン
- ⑦発明者 ヴォルフガング・ヴェ ドイツ連邦共和国グリュンシュタット・アウフ・デム・ラ
ツケルレ イメン 12
- ⑦発明者 ヨハン・ベルガー ドイツ連邦共和国イツフェルドルフ・イエーガーガツセ
10
- ⑦発明者 ハーヴィ・バツク アメリカ合衆国インディアナ・インディアナポリス・ハー
グ・ロード 9115
- ⑦発明者 ルツベルト・ヘルマン ドイツ連邦共和国ヴァイルハイム・イン・デア・アウ 23

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.